

莪术醇对人胚肺成纤维细胞增殖的影响

朱星, 杨长福*

(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的:探讨莪术醇对人胚肺成纤维细胞增殖抑制作用。方法:MTT法观察莪术醇对人胚肺成纤维细胞增殖的抑制作用;天狼猩红染色法测定细胞胶原的分泌能力,流式细胞术检测细胞周期时相分布。结果:50~200 mg·L⁻¹莪术醇作用细胞后能抑制人胚肺成纤维细胞的增殖和制胶原沉积,以96 h效果最为明显,并阻滞细胞停滞于G₀/G₁期,降低S期和G₂/M期细胞时相比例。结论:莪术醇通过将细胞周期阻滞于G₀/G₁,减少DNA复制,抑制人胚肺成纤维细胞增殖和细胞分泌胶原。

[关键词] 莪术醇;人胚肺成纤维细胞;胶原;细胞周期

[中图分类号] R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0226-03

Inhibiting Proliferation of Human Embro Fibroblasts by Curcumol

ZHU Xing, YANG Chang-fu*

(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the inhibiting the proliferation and the mechanism of human embro fibroblasts (MRC-5) by curcumol. **Method:** The effects of curcumol on the proliferation of MRC-5 were determined by MTT assay. The cotents of collagen accumulated were determined by the optical density at 540 nm of picro-sirius red staining. The cell cyclic retardation was examined by using floweytometry. **Result:** MTT showed that curcumol (50-200 mg·L⁻¹) had an inhibitory effect on the proliferation and had reduced collagen of secretion in MRC-5. The better time in the 96 hour. The cell cycle analysia showed that curcumol (50-200 mg·L⁻¹) increased the percentage of G₀/G₁ phase cells, updown the percentage of S and G₂/m phase cells. **Conclusion:** Curcumol can increase the percentage of G₀/G₁ phase cells, delay cell replication, inhibit the proliferation and collagen of secretion of MRC-5.

[Key words] curcumol; MRC-5; collagen; cell cycle

莪术醇(curcumol)又名姜黄环奥醇、姜黄醇,是由莪术、姜黄等中药中提取分离而得的化学成分,属萜类化合物。研究表明,莪术醇通过抑制多种肿瘤细胞增殖,以阻止RNA合成的作用^[1],通过诱导K562细胞分化而在白血病中显现较强的药理活性^[2]。在肺纤维化过程中,一个显著的特征是活化的成纤维细胞诱发细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积,使原有的降解和沉积的平衡被打破,进而引发正常肺结构破坏。本研究旨在探讨莪

术醇对肺成纤维细胞增殖和胶原沉积的影响,为开展中药有效成分抗肺纤维化提供实验依据。

1 材料

莪术醇(中国药品生物制品检定所,批号080301),人胚肺成纤维细胞株MRC-5(中国医学科学院细胞基础研究所),胎牛血清(HYCLONE公司),MEM培养液(北京迈晨科技有限公司),二甲亚砜(DMSO,北京化工有限公司),四甲基偶氮唑盐法(MTT)试剂(Sigma公司),天狼猩红-苦味酸溶液[海德(北京)生物技术有限公司]。

酶标仪(TECAN公司),倒置显微镜(Olympus),CO₂培养箱(日本索尼公司),流式细胞仪(BD公司)。

2 方法

2.1 莪术醇对MRC-5细胞生长的增殖抑制作用

[收稿日期] 20110627(009)

[基金项目] 贵州省科学技术厅贵阳中医学院科学技术联合基金项目(黔科合中药字[2010]LKZ7019号)

[通讯作者] *杨长福,副教授,博士,从事中医药防治肺纤维化研究, E-mail: yangchangfu@126.com

MTT 法测定细胞的增殖抑制作用。莪术醇用 DMSO 溶解至合适的浓度,作为储备液,临用前加入 MEM 培养液配制成所需的浓度。实验共设未处理组、莪术醇不同质量浓度组(25, 50, 100, 200 mg · L⁻¹)。取对数生长期细胞,以 0.25% 胰酶消化后,加入含血清培养基终止消化,离心,弃上清,再加入无血清的 MEM 培养液,反复吹打细胞,配成细胞悬液,计数并调整细胞密度为 2 × 10⁴ 个/L。以每孔 100 μL 接种细胞悬液入 96 孔培养板内,每组设 6 个复孔,将培养板放入 CO₂ 培养箱中,37 °C, 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 24 h,使细胞同步。吸弃上清,按组加入含有不同浓度莪术醇的培养液(血清含量为 1%),并设对照组继续培养 24, 48, 72 h。于每一时间点分别取出培养板,加入 5 g · L⁻¹ 的 MTT 溶液 15 μL, 37 °C 培养箱中继续培养 4 h 后终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,于酶标仪 570 nm 波长处测定各孔吸光度(A),以下式计算抑制率。各时间点重复 3 次,计算平均值。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{对照}}/A_{\text{测定}}) \times 100\%$$

2.2 莪术醇对 MRC-5 细胞胶原沉积影响 实验条件及分组同 2.1, 每组设 3 个复孔,细胞分别培养 24, 48, 72, 96 h 后各取出 1 块培养板,去除培养液,

表 1 不同质量浓度莪术醇在不同时间对 MRC-5 细胞的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

剂量 /mg · L ⁻¹	24 h		48 h		72 h	
	吸光度	抑制率/%	吸光度	抑制率/%	吸光度	抑制率/%
对照	0.532 1 ± 0.047 1	-	0.726 5 ± 0.028 5	-	0.743 7 ± 0.035 5	
25	0.529 6 ± 0.037 0	0.47	0.662 9 ± 0.058 9	7.48	0.642 5 ± 0.031 7	13.61
50	0.447 6 ± 0.063 6	15.88	0.609 5 ± 0.045 2	14.93	0.605 7 ± 0.029 1	18.56
100	0.431 2 ± 0.007 6	18.96	0.572 2 ± 0.016 4	20.14	0.536 9 ± 0.045 4 ¹⁾	27.81
200	0.409 8 ± 0.018 7	22.98	0.564 3 ± 0.060 4	21.24	0.431 8 ± 0.059 7 ¹⁾	41.94

注:与对照组相比¹⁾P < 0.05。

3.2 莪术醇对 MRC-5 细胞分泌胶原的影响 莪术醇对 MRC-5 细胞分泌胶原的影响随作用药物的浓度增加吸光度值逐渐减小,结果见表 2。MRC-5 细胞产生胶原的量随培养时间的增长而逐渐增加;莪术醇作用于 MRC-5 细胞后,各药物浓度均能抑制 MRC-5 分泌胶原,以药物作用 96 h 的效果最为明显,莪术醇 50, 100, 200 mg · L⁻¹ 能显著抑制细胞胶原分泌,有统计学意义(P < 0.05)。

3.3 莪术醇对 MRC-5 细胞周期分布的影响 流式细胞术检测结果表明,莪术醇在 25 ~ 200 mg · L⁻¹,

预冷甲醇 -20 °C 固定过夜, PBS 洗 1 遍; 0.1% 天狼猩红-苦味酸染液室染 1 h, 去除染液, 0.1% 冰醋酸溶液洗涤 3 遍, 每孔加入 0.1 mol · L⁻¹ NaOH 溶液 100 μL 室温作用 1 h, 振荡混合后, 于 540 nm 处测定吸光度。

2.3 莪术醇对 MRC-5 细胞周期的影响 取对数生长期的 MRC-5 细胞, 胰酶消化, 1% 胎牛血清 MEM 培养液重悬, 制成细胞悬液, 接种于 6 孔板中, 5 × 10⁵ 个/孔, 37 °C, 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 24 h, 使细胞同步。随机按莪术醇 25, 50, 100, 200 mg · L⁻¹ 刺激细胞, 同时设立对照组, 于 24 收获细胞, 70% 乙醇 4 °C 固定过夜, RNase A 处理, PI 避光染色, 2 h 内上流式细胞仪检测细胞周期分布, 实验重复 3 次。

2.4 统计分析 试验结果用 SPSS 13.0 统计软件统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 莪术醇对 MRC-5 的增殖抑制作用 莪术醇在 25 ~ 200 mg · L⁻¹ 对不同时段的人胚肺成纤维细胞 MRC-5 增殖有抑制作用, 结果见表 1。结果显示, 随药物剂量增加, 作用时间延长, 抑制细胞增殖的作用也明显增强, 呈现时间-剂量-效应关系。

将 MRC-5 细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 降低 S 期和 G₂/M 期细胞时相比例, 结果见表 3。

表 2 莪术醇对 MRC-5 细胞分泌胶原(A)的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

剂量 /mg · L ⁻¹	时间		
	48 h	72 h	96 h
对照	0.137 4 ± 0.002 8	0.185 7 ± 0.004 5	0.259 3 ± 0.012 7
25	0.121 3 ± 0.011 8	0.124 6 ± 0.004 2	0.185 5 ± 0.047 5
50	0.114 5 ± 0.005 3	0.111 4 ± 0.010 4 ¹⁾	0.138 9 ± 0.038 2 ¹⁾
100	0.115 6 ± 0.005 2	0.100 4 ± 0.004 2 ¹⁾	0.121 6 ± 0.0064 ¹⁾
200	0.111 5 ± 0.004 2	0.103 0 ± 0.008 7 ¹⁾	0.100 6 ± 0.003 1 ²⁾

注:与对照组相比¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

4 讨论

肺纤维化是多种原因引起慢性肺疾病的共同结局,现明确的致病因素有药物毒性作用、环境暴露、结缔组织病等^[1],肺纤维化(pulmonary fibrosis, IPF)是一种慢性、进行性恶化的肺间质疾病,是多种原因引起的慢性肺疾病的共同结局,多以成纤维细胞和肌成纤维细胞增殖,成纤维细胞灶的形成和细胞外基质(ECM)的过度沉积为主要病理特征^[3-4],由于慢性炎性细胞的浸润,促使肺泡细胞活化并向间质迁移,形成间质性肺炎,随着炎性细胞释放细胞因子增多,出现间质水肿,进而在肺泡区形成透明膜。如果病程持续时间延长,逐渐有成纤维细胞增生,使得活化的间质细胞亦想成纤维细胞转化,伴随成纤维细胞/肌成纤维细胞灶和细胞外基质(ECM)大量聚积、炎症过度修复而发展为间质纤维化^[5]。在肺成纤维细胞在肺组织中的异常增殖和 ECM 的过度积聚在肺纤维化过程中的重要角色,因此,围绕肺成纤维细胞的增殖抑制开展的研究是防治肺纤维化的有效手段之一。

表 3 莪术醇作用 24 h 对 MRC-5 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

剂量 /mg · L ⁻¹	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照	58.16 ± 1.32	27.43 ± 4.39	14.41 ± 3.70
25	63.15 ± 4.28	26.09 ± 0.85	10.76 ± 3.51
50	67.71 ± 7.64	24.55 ± 5.77	7.75 ± 2.73
100	72.46 ± 4.83	20.71 ± 4.08	6.84 ± 0.76
200	79.13 ± 1.12	14.37 ± 3.44	6.50 ± 3.39

莪术醇来源于姜黄、莪术等天然植物,具有广泛的药理活性^[6-8],如抗肿瘤、抗纤维化等。本研究以人胚肺成纤维细胞 MRC-5 为研究对象,研究莪术醇对 MRC-5 细胞增殖、胶原分泌及细胞周期的影响。结果发现,莪术醇能显著抑制 MRC-5 细胞的增殖,减少细胞胶原的分泌,影响细胞 DNA 的合成,将其阻滞于 G₀/G₁ 期,并有明显的剂量依赖性。

细胞周期是细胞的物质积累与细胞分裂的循环过程。连续分裂的细胞从一次有丝分裂结束开始,经过物质积累,到下一次有丝分裂结束所经历的全过程称为 1 个周期,在这个过程中,细胞遗传物质复制并加倍,并且在分裂结束时平均分配到 2 个子

细胞中去。流式细胞术根据细胞在不同时相 DNA 含量差异,用 DNA 染料染色瞬时测定细胞核中 DNA 的含量确定细胞处于何种时相当中。本研究表明,莪术醇作用细胞 24 h 后,随剂量增大, G₀/G₁ 期细胞的比例呈线性增加, S 期和 G₂/M 期细胞比例下降,说明莪术醇能引发 MRC-5 细胞周期时相的改变,将细胞停滞于静息期,减少 DNA 的复制,影响细胞的增殖和分泌胶原的能力。

综上所述,莪术醇抑制人胚肺成纤维细胞 MRC-5 的增殖可能与其影响细胞的 DNA 复制有关,进而影响细胞产生胶原的能力,发挥抗肺纤维化的作用。具体的作用机制有待于进一步的整体动物实验研究证实。

[参考文献]

[1] 徐立春,边可君,刘志敏,等.天然药物莪术醇抑制肿瘤细胞生长及 RNA 合成影响的初步研究[J].肿瘤,2005,25(6):570.

[2] 林海,李晓辉.莪术醇诱导慢性粒细胞白血病 K562 细胞分化的研究[J].现代生物医学进展,2007,7(11):1674.

[3] Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis: New insights in its pathogenesis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34(12):1534.

[4] Selman M, King T E, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy[J]. Ann Intern Med, 2001, 134(2):136.

[5] Moisés Selman, Annie Pardo. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Proc Am Thorac Soc, 2006,3:364.

[6] 高艳娥,郭金珠,惠慧,等.莪术醇对人宫颈癌 CASKI 细胞增殖抑制及促凋亡作用的研究[J].现代肿瘤医学,2009,17(10):1836.

[7] 江远,李泽松,江福生,等.莪术醇对肝星状细胞-T6 细胞基因表达的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2005,13(3):144.

[8] 阎田玉,郑企静,周光延,等.莪术静脉注射液治疗小儿呼吸道合胞病毒肺炎及其作用原理的研究[J].中国中西医结合杂志,1992,12(12):713.

[责任编辑 邹晓翠]